

## طراحی بیوانفورماتیکی دئوکسی ریبوزایم ۲۳-۱۰ علیه ناحیه غیر ترجمه شونده قبل از کدون آغاز ژن بتاگالاکتوزیداز (*lacZ*) در ناقل pGEM-T

ساناز صادقی<sup>۱</sup>، ابوالقاسم اسماعیلی<sup>۲\*</sup>، فاطمه جوادی زرنقی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>دانشجو، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران؛ <sup>۲</sup>گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۱۹

### چکیده:

زمینه و هدف: دئوکسی ریبوزایم‌ها الیگودئوکسی ریبونوکلئوتیدهایی هستند که کاتالیز واکنش‌هایی مثل برش RNA را انجام می‌دهند و کاربردهای تشخیصی و درمانی دارند. دئوکسی‌ریبوزایم ۲۳-۱۰ شامل یک دومین کاتالیتیک وابسته به کاتیون ۱۵ نوکلئوتیدی ثابت و دو بازوی متصل شونده متغیر است که باعث اختصاصیت آنزیم می‌شوند. اپران لاکتوز در فرایند غربالگری سفید-آبی کاربرد دارد، این اپران شامل ۳ ژن به صورت پلی سیستمیک است. در این تحقیق بیوانفورماتیکی دئوکسی ریبوزایمی علیه ژن آلفا پپتید بتاگالاکتوزیداز در اپران لاکتوز طراحی شد.

روش بررسی: نقشه ژنی پلاسمید pGEM-T از سرور addgene گرفته و توالی ژن آلفا پپتید مشخص شد. سپس با مقایسه توالی پروتئینی با قالب‌های خوانشی مختلف منتج از سایت expasy، قالب خوانشی صحیح انتخاب گردید. در این مرحله، کل توالی مکمل معکوس شد تا توالی mRNA به دست آید. ساختار ثانویه با کمترین انرژی آزاد از سرور mfold گرفته شد و یک ناحیه فاقد ممانعت فضایی در آن پیدا شد. با توجه به اینکه دئوکسی‌ریبوزایم ۲۳-۱۰ قابلیت برش بین یک پورین جفت نشده و یک پیریمیدین جفت شده را دارد؛ یک AC در جایگاه اتصال ریبوزوم در ناحیه غیر ترجمه شونده انتخاب شد و ۹ باز در طرفین آن، به‌عنوان بازوهای متصل شونده در نظر گرفته شد. بررسی عدم وجود توالی مشابه در باکتری میزبان توسط سرور NCBI انجام شد. درنهایت فعالیت و اتصال دئوکسی‌ریبوزایم توسط سرور mfold پیش‌بینی شد.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق نشان داد که دئوکسی ریبوزایم طراحی شده دارای Tm نسبتاً بالا با دو بازوی هم اندازه ۹ نوکلئوتیدی است که کارایی آن را افزایش می‌دهد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند برای کنترل بیان ژن *lacZ* به‌عنوان یک نشانگر زیستی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: دئوکسی‌ریبوزایم، جایگاه اتصال ریبوزوم، ساختار ثانویه، دمای اتصال، پلاسمید pGEM-T.

### مقدمه:

شناخته می‌شود یک مولکول تک رشته DNA با قابلیت کاتالیتیکی است. DNAzymes فعالیت‌های عملکردی مختلفی مثل RNA ligation، تشکیل باند کربن-کربن و شکست هیدرولیتیک DNA دارند و بهترین و کارآمدترین عملکرد آن‌ها تجزیه RNA است (۲، ۳). دئوکسی‌ریبوزایم‌ها الیگونوکلئوتیدهایی تک‌رشته‌ای با طول ۲۸-۳۱ نوکلئوتیدی هستند که از طریق بازوهای

رویکرد جاری در ژنتیک مولکولی دستیابی روش‌های جدید برای مهار بیان ژن‌ها (Gene silencing) است. ازجمله این روش‌ها، می‌توان به استفاده از RNA های مداخله‌گر کوچک (Small interfering RNA= siRNA)، الیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس (Antisense oligonucleotides= ODNs)، ریبوزایم‌ها و دئوکسی‌ریبوزایم‌ها اشاره کرد (۱). دئوکسی‌ریبوزایم که همچنین با عنوان DNAzyme یا DNA enzyme

\*نویسنده مسئول: اصفهان- دانشگاه اصفهان- گروه زیست‌شناسی- تلفن: ۰۹۱۳۷۱۵۲۵۱۱، E-mail: aesmaeili@sci.ui.ac.ir

متصل شونده خود به توالی‌های نوکلئوتیدی خاصی در mRNA هدف باند می‌شوند و باعث شکست پیوند فسفودی استر و تشکیل ۲ قطعه RNA می‌شود. بازوهای متصل شونده ۷ نوکلئوتید یا بیشتر طول دارند. اختصاصیت برش در اثر مکمل بودن همین بازوها با جایگاه هدف در mRNA به وجود می‌آید. این آنزیم‌ها شامل یک دومین کاتالیتیک وابسته به کاتیون هستند. سنتز DNAzyme به‌طور طبیعی اتفاق نمی‌افتد و در یک فرایند برون‌تنی انتخابی (*in vitro selection*) انجام می‌شود (۵،۴).

در سال‌های مختلف روی مهار ژن‌های مختلف HIV مطالعاتی انجام شده است (۶،۷). همچنین بررسی‌هایی روی ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک به‌منظور غربالگری فعالیت آنزیم در باکتری‌ها انجام شده که این به نوبه خود پنجره‌ای رو به رفع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در درمان عفونت‌ها باز می‌کند (۸-۱۰). در سال ۱۹۹۹ مهار بیان انکوژن bcr-abl توسط DNAzyme انجام شد (۱۱). در سال‌های اخیر هم دئوکسی‌ریبوزایم‌ها به‌طور وسیعی در تحقیقات سرطان استفاده شده‌اند. ازجمله در استفاده DNAzyme در مقابل Egr-1 که باعث مهار رشد تومور در سرطان سینه می‌شود. همچنین c-jun، c-myc، Aurora kinase و (Vascular endothelial growth factor= VEGF) هدف DNAzyme قرار گرفته و نتایج خوبی در مهار تومور نشان دادند (۱۶-۱۲).

در استفاده از دئوکسی‌ریبوزایم‌ها مهم‌ترین بخش طراحی صحیح و اصولی دئوکسی‌ریبوزایم است. در این تحقیق، طراحی صحیح یک دئوکسی‌ریبوزایم ۲۳-۱۰ علیه ژن  $\alpha$ -peptide از بتا‌گالاکتوزیداز در اپران لاکتوز انجام گرفته است. DNA و RNA به عنوان اسیدنوکلئیک‌ها، از مزیت‌های ذاتی بسیاری به‌عنوان واکنشگر نسبت به پروتئین برخوردارند. توالی‌های اسیدنوکلئیک سنتزی با عملکرد آنزیمی می‌توانند از بین

توالی‌های تصادفی شناسایی شوند. در مقابل، انجام انتخاب برون‌تنی از توالی‌های تصادفی پروتئینی بسیار سخت و پیچیده است. شناسایی آنزیم‌های پروتئینی جدید توسط انتخاب برون‌تنی از بین توالی‌های آمینواسیدی تصادفی با در نظر گرفتن تعداد توالی‌های تصادفی ممکن، غیر قابل‌دسترس است. علاوه بر این، به علت طبیعت پیچش تعاونی پروتئین‌ها، بیشتر توالی‌های پروتئینی تصادفی نمی‌توانند هر ساختار ۳ بعدی مورد نظری را به خود بگیرند. همچنین همه ابزارهای بیوشیمیایی ضروری برای شناسایی ریبوزایم‌ها و دئوکسی‌ریبوزایم‌های جدید توسط انتخاب برون‌تنی قابل‌دسترس است. مخصوصاً DNA پلیمراز، که اجازه تکثیر توالی‌های DNA توسط PCR را می‌دهد، برای ریبوزایم‌ها نیز ترانس کریپتاز معکوس و RNA پلیمراز در دسترس است. در مقابل، انتخاب برون‌تنی از توالی‌های تصادفی پروتئینی غیرممکن است. فقدان ابزاری برای کپی کردن توالی‌های آمینواسیدی دلخواه یک سد رفع نشدنی برای این منظور است. در بین خود نوکلئیک اسیدها، DNA به علت پایداری آنزیمی و شیمیایی، هزینه و آسانی سنتز مورد توجه ویژه است (۱۷). دئوکسی‌ریبوزایم در مقایسه با ریبوزایم اختصاصیت، فعالیت و پایداری بیشتری دارد. (۲). بنابر اهمیت روزافزون دئوکسی‌ریبوزایم‌ها، طراحی یک دئوکسی‌ریبوزایم مناسب حائز اهمیت است. برای انجام این تحقیق آشنایی با ساختار و ویژگی‌های دئوکسی‌ریبوزایم ۲۳-۱۰ و همچنین آشنایی کلی با اپران لاکتوز نیاز است.

دئوکسی ریبوزایم الیگودئوکسی‌ریبونوکلئوتیدی است که توانایی اتصال به توالی‌های ویژه سوبسترا DNA و RNA را دارد. دئوکسی‌ریبوزایم‌ها کوچک‌تر و کارآمدتر از ریبوزایم‌ها هستند و در مقایسه با ریبوزایم‌ها، اختصاصیت بیشتری دارند (۳-۱۵، ۱۸، ۱۹). دئوکسی ریبوزایم‌ها به‌طور طبیعی یافت نمی‌شوند، اما قابل سنتز

طی فرایند انتخاب برون تنی (*in vitro selection*) هستند (۲۱،۲۰). به عبارتی، سنتز این آنزیم‌ها در شرایط آزمایشگاهی و خارج از سلول انجام می‌گیرد. انواع مختلف دئوکسی‌ریبوزایم در هسته کاتالیتیک و همچنین در نوع کوفاکتورهای مورد نیاز باهم متفاوت هستند (۷). توالی سوبسترا می‌تواند تغییر کند، بدون اینکه فعالیت کاتالیتیکی این آنزیم‌ها از دست برود (۲). دئوکسی‌ریبوزایم ۲۳-۱۰ به‌طور وسیعی استفاده می‌شود و توانایی دارد که هر توالی DNA را با اختصاصیت و بازده سینتیک بالا بشکند. اسم ۲۳-۱۰ از کلون ۲۳rd و از چرخه ۱۰th فرایند انتخاب برون تنی گرفته شده است. از یک هسته کاتالیتیکی فعال ۱۵ نوکلئوتیدی ساخته شده است که توسط دو بازوی متصل شونده پوشیده شده است. توالی هسته کاتالیتیک GGCTAGCTACAACGA است. هر سوبسترا RNA را در پیوند فسفودی استر بین یک پورین جفت نشده و یک پیریمیدین جفت شده، در حضور یون  $Mg^{2+}$  برش می‌دهد (۶). دو محصول شکسته یکی به‌صورت 2'-3'-cyclic phosphate و یکی با یک گروه 5'-OH در انتها ایجاد می‌شود (۲).

اپران لاکتوز ۳ منطقه کدکننده *lacY*، *lacZ*، *lacA* دارد که به‌صورت پلی‌سیسترونیک کنار هم قرار گرفته‌اند و به ترتیب  $\beta$ -galactosidase، permease و transacetylase را کد می‌کنند. بتاگالاکتوزیداز و ترانس استیلاز مسئولیت شکستن لاکتوز به گلوکز و گالاکتوز را بر عهده دارند. پرمناز مسئول وارد کردن لاکتوز به داخل سلول است. پروتئین تنظیم‌کننده یا بازدارنده توسط ناحیه *lacI* کد شده و به‌صورت تترامر به ناحیه اپراتور (O) می‌چسبد و از رونویسی اپران جلوگیری می‌کند (۲۲). در زمانی که لاکتوز در محیط وجود دارد لاکتوز به بازدارنده متصل می‌شود و آن را از اپراتور بلند می‌کند. در نتیجه آنزیم RNA پلی‌مراز

می‌تواند به‌راحتی به پروموتور بچسبد و رونویسی را آغاز کند، بنابراین اپران بیان می‌شود. پس از کاهش یافتن و کاتابولیسم لاکتوز دوباره بازدارنده به اپراتور می‌چسبد و از بیان آن جلوگیری می‌کند (۲۳).

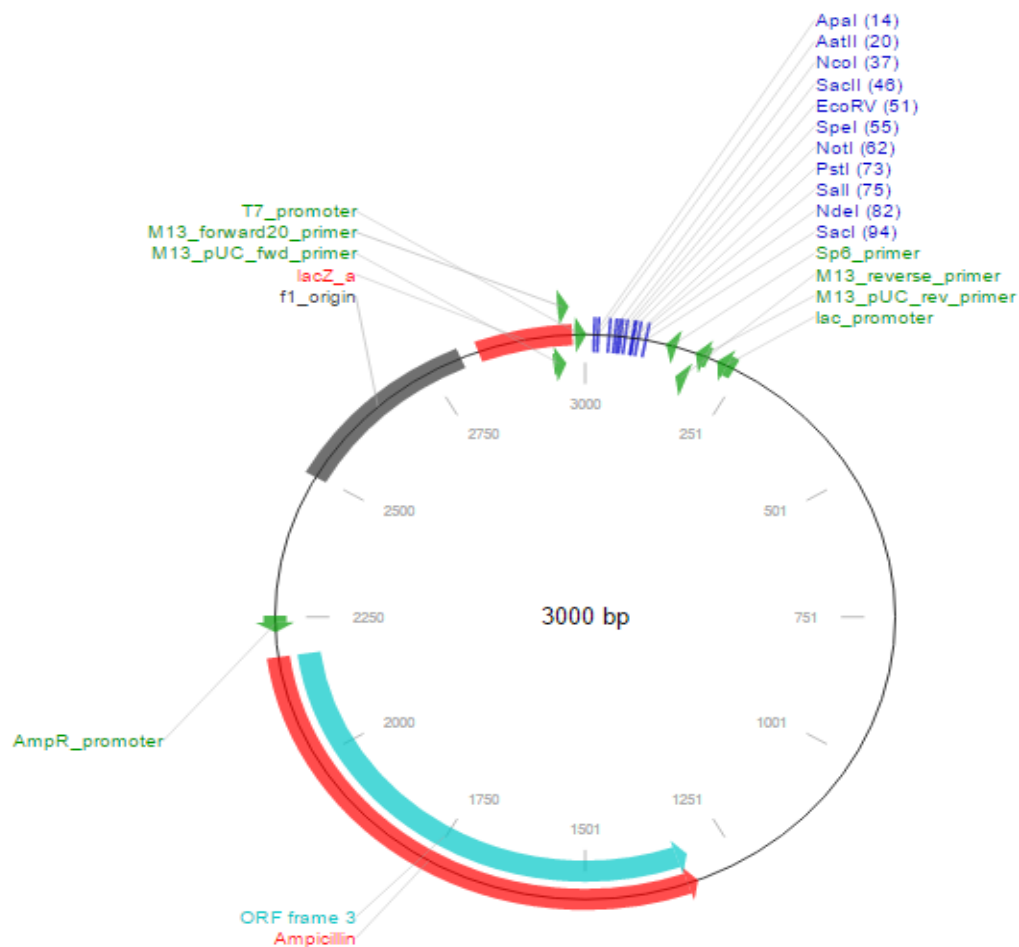
آنالوگ‌های لاکتوز از جمله IPTG (*Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside*) می‌تواند به پروتئین رپرسور متصل شوند و باعث روشن شدن اپران لاکتوز شوند. یک آنالوگ فاقد رنگ لاکتوز X-Gal با فرمول شیمیایی 5-bromo-4-chloro-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside است. بتاگالاکتوزیداز می‌تواند ترکیب بدون رنگ X-Gal را بشکند و یک محصول آبی‌رنگ با فرمول 5-5'-dibromo-4-4'-dichloro-indigo تولید کند (۱۴،۲۴).

فرم فعال بتاگالاکتوزیداز یک آنزیم تترامر است. حذف آمینواسیدهای ۱۱ تا ۴۱ از بتاگالاکتوزیداز جهش *lacZ* $\Delta$ M15 نامیده می‌شود. این جهش باعث می‌شود که آنزیم قادر به ساختن تترامر فعال نباشد و حتی با روشن بودن اپران لاکتوز ارگانیزم قادر به تجزیه لاکتوز نیست. آمینواسیدهای ۱ تا ۵۹ از بتاگالاکتوزیداز را  $\alpha$ -peptide می‌نامند. این ژن در پلاسمید pGEM-T حضور دارد. طبق بررسی پژوهشگران مطالعه‌ی حاضر، تاکنون گزارش منتشر شده‌ای در رابطه طراحی دئوکسی‌ریبوزایم علیه ژن *lacZ* یافت نشده است.

در این تحقیق عملکرد دئوکسی‌ریبوزایم ۲۳-۱۰ طراحی شده علیه ژن *lacZ* توسط پایگاه داده‌ها و نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفته و پیش‌بینی می‌شود.

## روش بررسی:

در ابتدا، به‌منظور مشخص کردن توالی ژن *lacZ*- $\alpha$  نقشه کامل ژنتیکی pGEM-T vector از سایت addgene گرفته شد.



تصویر شماره ۱: نقشه ژنتیکی پلاسمید

ژنوم پلاسمید در این تصویر نشان داده شده است. ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و ژن مربوط به *lacZ* با رنگ قرمز مشخص شده است. همچنین جهت پروموتور ژن *lacZ* توسط فلش سبز رنگ مشخص شده است.

ناحیه کد کننده *lacZ-a* در سایت addgene همان ناحیه معادل ۲۹۸۰-۲۸۳۲ است. با توجه به جهت پروموتور، توقع می‌رود (Open reading frame= ORF) از سمت ۳' به ۵' باشد. برای مشخص نمودن قطعی ORF صحیح از سایت ExPASy استفاده شده است. توالی‌های آمینواسیدی حاصل از هر کدام از قالب‌های خوانشی توسط نرم‌افزار CLC با توالی آمینواسیدی *lacZ* مقایسه شد. مشاهده شد که *Frame 3 ORF* ۵' 3' با توالی *lacZ* شباهت دارد. پس کل توالی اپران لاکتوز که به اکسپاسی داده شد (شامل پرایمرها و MCS و خود *lacZ*) را مکمل معکوس کردیم تا توالی mRNA به دست آید.

ژنوم این پلاسمید ۳۰۰۰ جفت باز است. ژن *lacZ-a* از باز ۲۸۳۲ شروع شده و تا باز ۲۹۸۰ ادامه می‌یابد. این در حالی است که پروموتور *lac* در ناحیه ۲۱۰ تا ۲۳۹ واقع شده است. بنابراین، پروموتور *lacZ-a* رو به عقب است. در نتیجه اپران لاکتوز شامل کل این منطقه از ابتدای پروموتور (باز ۲۰۹) رو به عقب تا ابتدای ژن *lacZ-a* (باز ۲۸۳۲) است. البته این ناحیه، قبل از اینکه به ژن *lacZ-a* برسد، تعدادی توالی پالیندروم جهت برش آنزیمی دارد. همچنین، توالی پرایمرهای توالی یابی m13، SP6 دارد. هرچند تمام این توالی‌ها (مکمل معکوس‌شان) در mRNA حضور خواهند داشت، اما هنوز به عنوان ناحیه کد کننده *lacZ-a* نیستند.

**5'3' Frame 1**  
 SGCATV GKGDRCGPL RYYASWRK G DVLQGD Stop V  
 G Stop RQGFPSHDVVKRRP VNCNTTHYRANWARRR  
 Met L P A A Met A A G Y H Stop C G R L Q V D H Met G E L P T R W  
 Met H S L S I L Stop C H L N S L A Stop S W S Stop L F P V Stop N C Y P  
 L T I P H

**5'3' Frame 2**  
 QAAQLLGRAIGAGLFAITPAGERG Met CCKAIAIKLGN  
 ARVFPVTTL Stop NDGQ Stop IVIRLTIGRIGPDVACSR  
 PPWPRDITSAACRSTIWESSQRVGCIA Stop VFYSV  
 T Stop IAWRNHGHSCFLCEIVIRSQFH

**5'3' Frame 3**  
 RL RNCWEGRSVRASSLLRQLAKGGCAARRLSWVT  
 PGFSQSRRCKTTASEL Stop YDSL Stop GELGPTSHAPG  
 RHGRGISLVRPPAGRPYGRAPNALDA Stop LEYSIVS  
 PK Stop L G V I Met V I A V S C V K L L S A H N S T

**3'5' Frame 1**  
 V W N C E R I T I S H R K Q L Stop P Stop L R Q A I Stop V T L Stop N T  
 Q A Met H P T R W E L S H Met V D L Q A A A L V I S R G H G G R E H  
 A T S G P I R P I V S R I T I H W P S F Y N V V T G K T L A L P N L I A L  
 Q H I P L S P A G V I A K R P A P I A L P N S C A A Stop

**3'5' Frame 2**  
 C G I V S G Stop Q F H T G N S Y D H D Y A K L F R Stop H Y R I L K L  
 C I Q R V G S S P I W S T C R R P H Stop Stop Y P A A Met A A G S Met  
 R R R A Q F A L Stop Stop V V L Q F T G R R F T T S Stop L G K P W R  
 Y P T Stop S P C S T S P F R Q L A Stop Stop R R G P H R S P F P T V A Q  
 P

**3'5' Frame 3**  
 V E L Stop A D N N F T Q E T A Met T Met I T P S Y L G D T I E Y S S Y  
 A S N A L G A L P Y G R P A G G R T S D I P R P W R P G A C D V G P N  
 S P Y S E S Y Y N S L A V V L Q R R D W E N P G V T Q L N R L A A H P  
 P F A S W R N S E E A R T D R P S Q Q L R S L

## تصویر شماره ۲: توالی‌های ORF منتج از سایت ExPacy با توجه به توالی اپران lac

قالب‌های خوانشی مختلف ژن مورد نظر در تصویر نشان داده شده است.

mRNA می‌شود (۲۵)؛ بنابراین یک منطقه مناسب برای انتخاب جایگاه هدف همین جایگاه اتصال ریبوزوم (Ribosome binding site= RBS) است که نقش مهمی در بازده ترجمه دارد. توالی شاین دالگرنو در توالی RNA ژن *lacZ* یافت نشد و نمی‌توان حدس زد توالی شاین دالگرنو کجای این توالی است؛ بنابراین به‌طور عام ناحیه غیر ترجمه شونده (Untranslated region= UTR) انتهای ۵' برای انتخاب جایگاه هدف مشخص شد.

در تحقیق حاضر بررسی ساختار ثانویه mRNA با استفاده از نرم‌افزار mfold صورت گرفته است. ساختار ثانویه با کمترین انرژی آزاد از سرور mfold گرفته شده است. اهمیت بررسی ساختار ثانویه mRNA به این دلیل است که قابل‌دسترس بودن جایگاه برش در ساختار ثانویه برای عملکرد مناسب با بازده کارآمد لازم است؛ بنابراین با بررسی ساختار ثانویه، یک ناحیه فاقد ممانعت فضایی انتخاب شده است. انتخاب جایگاه هدف در نواحی که لوپ وجود دارد مساعدتر است، زیرا امکان باز شدن

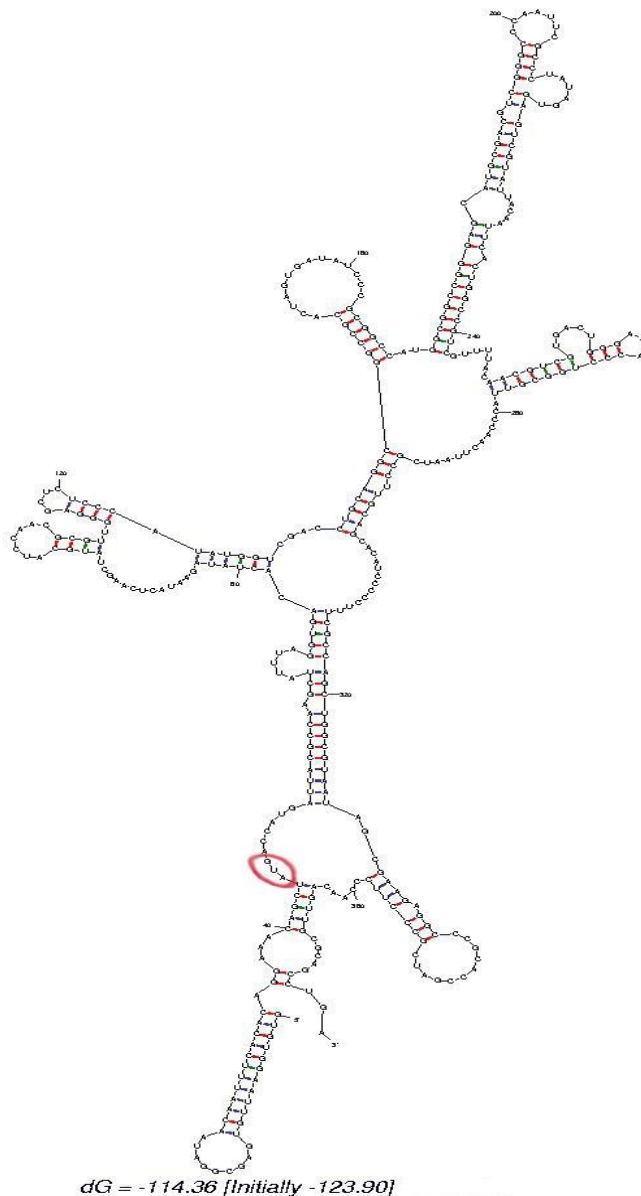
در پروکاریوت‌ها در ناحیه mRNA، قبل از کد آغازی، یک سری توالی نوکلئوتیدی به‌عنوان توالی رهبر یا پیشرو در نظر گرفته می‌شوند. این توالی مکمل توالی نوکلئوتیدی در سمت ۳' rRNA 16S در زیر واحد کوچک ریبوزوم است و به‌واسطه آن زیر واحد کوچک ریبوزوم به mRNA متصل می‌شود. این توالی غنی از پورین توالی شاین دالگرنو (Shine-Dalgarno sequence= SD) نام دارد. توالی این بخش ریبوزوم به‌صورت 5'-CCUCCU-3' است و نحوه اتصال به شکلی است که هنگام اتصال زیر واحد بزرگ، رمز آغاز در جایگاه P قرار گیرد. توالی SD معمولاً ۸ جفت باز در بالادست کدون آغاز (AUG) قرار دارد. توالی SD به آوردن ریبوزوم به mRNA کمک می‌کند تا سنتز پروتئین را آغاز کند. این ۶ باز AGGAGG توالی عام است. جهش در توالی شاین دالگرنو می‌تواند باعث کاهش یا افزایش ترجمه در پروکاریوت‌ها شود؛ زیرا باعث کاهش یا افزایش بازده جفت شدن ریبوزوم و

ساختار و اتصال دنوکسی ریبوزایم بیشتر است. در ناحیه غیر ترجمه شونده انتهای ۵' در فاصله ۴ باز قبل از کدون آغاز، یک لوپ دیده می شود. این ناحیه به علت گسستگی

که دارد می تواند جایگاه مناسبی برای طراحی آنزیم باشد؛ بنابراین به منظور یافتن دو باز پورین- پیریمیدین این ناحیه مورد بررسی قرار گرفته شد.

Output of sir\_graph (9)  
mfold\_v3.5.2

Created Thu May 7 04:09:02 2015



dG = -114.36 [Initially -123.90]

### تصویر شماره ۳: ساختار ثانویه توالی mRNA ژن lacZ-α

کدون آغاز ترجمه توسط دایره قرمز رنگ مشخص شده است. برای طراحی دنوکسی ریبوزایم ناحیه قبل از دایره قرمز رنگ که ناحیه غیر ترجمه شونده است، در نظر گرفته شده است. این ناحیه به علت وجود لوپ برای طراحی دنوکسی ریبوزایم از نظر ساختاری مناسب است.

با توجه به بررسی ساختار ثانویه و عدم وجود ممانعت فضایی یک توالی AC در فاصله ۴ باز قبل از کدون آغاز به عنوان جایگاه برش در نظر گرفته شد.

طراحی دنوکسی ریبوزایم در این ناحیه انجام شد. تعداد ۹ باز در طرفین نقطه مورد نظر به عنوان بازوهای متصل شونده در نظر گرفته شد. بررسی عدم وجود توالی مشابه

به دست آوردن  $T_m$  فرمول‌های مختلفی وجود دارد. با استفاده از پایگاه داده‌های مختلف  $T_m$  calculator می‌توان  $T_m$  الیگونوکلئوتید مورد نظر را بررسی کرد. توالی مورد نظر از لحاظ  $T_m$  بررسی و تأیید شد. در پایان پس از اینکه دمای اتصال و ساختار ثانویه هدف بررسی شد و جایگاه هدف مورد نظر تأیید شد، برای طراحی آنزیم ابتدا توالی جایگاه هدف را مکمل معکوس نمودیم. در این مرحله دقت شد که دئوکسی‌ریبوزایم ۲۳-۱۰ بین یک پورین جفت نشده و یک پیریمیدین جفت شده را برش می‌دهد؛ بنابراین در توالی آنزیم مکمل باز A در جایگاه برش AC قرار داده نمی‌شود تا باز A به صورت جفت نشده بماند. سپس توالی ثابت هسته کاتالیتیک دئوکسی‌ریبوزایم ۲۳-۱۰ را در وسط توالی اضافه کردیم.

در باکتری میزبان توسط سرور ncbi انجام شد؛ بنابراین از طریق این سرور از عدم برش نواحی دیگر توسط دئوکسی‌ریبوزایم و اختصاصیت آنزیم اطمینان حاصل شد. وجود توالی مشابه در ژنوم میزبان اگر در ژن‌های حیاتی میزبان باشد، می‌تواند باعث از بین رفتن احتمالی باکتری‌ها شده و روی زنده‌مانی باکتری‌ها اثر بگذارد. به همین علت بررسی عدم وجود توالی مشابه حائز اهمیت است. در نهایت اتصال دئوکسی‌ریبوزایم توسط سرور mfold پیش‌بینی شد. در طراحی دئوکسی‌ریبوزایم پارامتر  $T_m$  (Melting temperature) حائز اهمیت است. این پارامتر بیانگر درجه حرارتی است که در آن ۵۰٪ الیگونوکلئوتیدها به الگو متصل شده‌اند.  $T_m$  به طول الیگونوکلئوتید و توالی آن بستگی دارد. هرچه بازهای C و G بیشتر باشند  $T_m$  نیز بیشتر است. برای



### تصویر شماره ۳: مراحل تعیین توالی دئوکسی‌ریبوزایم

برای به دست آوردن توالی دئوکسی‌ریبوزایم توالی هدف مکمل معکوس شده سپس هسته کاتالیتیک ثابت دئوکسی‌ریبوزایم ۲۳-۱۰ در وسط آن اضافه شده است.

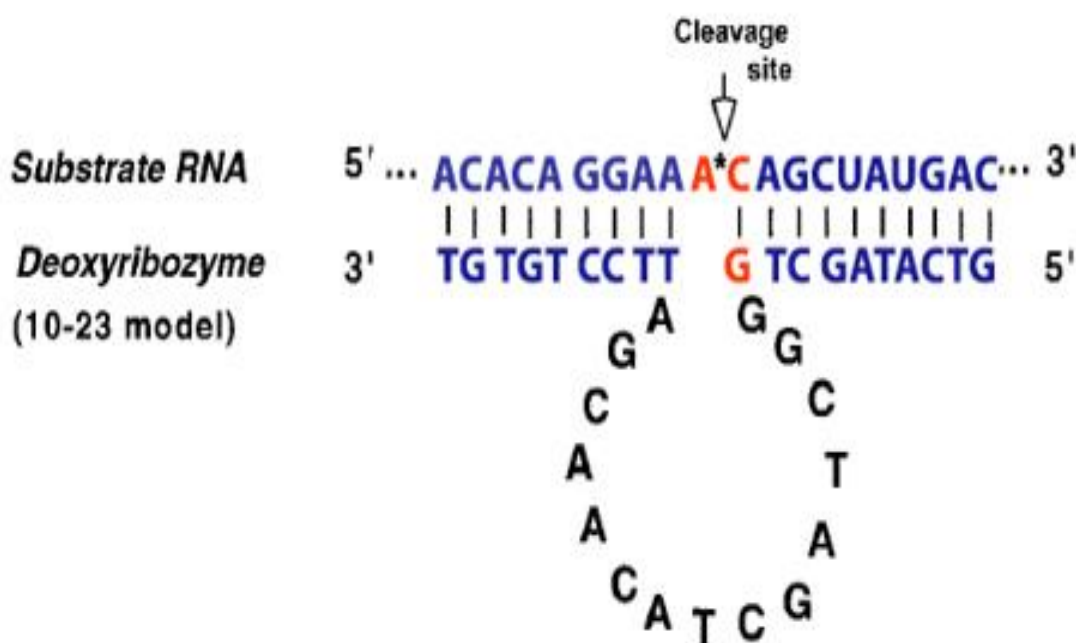
### یافته‌ها:

اتصال دئوکسی‌ریبوزایم و ساختار ثانویه هدف در طراحی دئوکسی‌ریبوزایم‌ها حائز اهمیت هستند. اتصال مناسب دئوکسی‌ریبوزایم طراحی شده به توالی

طول بازوهای متصل، متقارن بودن یا نبودن بازوهای متصل شونده، عدم تغییر در هسته کاتالیتیکی دئوکسی‌ریبوزایم، جایگاه هدف و دمای

mRNA هدف بسیار مهم است. سعی شد جایگاه هدف را به گونه‌ای انتخاب شود که  $T_m$  نسبتاً بالایی داشته باشد. در دماهای پایین‌تر از  $T_m$  بیشتر ترکیب دو رشته دارد؛ بنابراین با وجود  $T_m$  بالاتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد که دمای رشد باکتری است، درصد اتصال بیشتری وجود خواهد داشت.  $T_m$  دئوکسی ریبوزایم توسط نرم‌افزار  $T_m$  calculator بررسی شد. بررسی توسط نرم‌افزار  $T_m$  calculator نشان داد که دئوکسی ریبوزایم طراحی شده دارای کیفیت مطلوب است. در مورد طول بازوهای متصل شونده، طول ۹ نوکلئوتیدی و دو بازوی هم‌اندازه

انتخاب شد. دلیل این انتخاب رسیدن به دمای اتصال مطلوب بود. همچنین، طول ۹ باز برای بازوهای متصل شونده طبق گزارش‌ها قبلی انجام شده، بازده مطلوبی خواهد داشت. علاوه بر این بازوهای متصل شونده برابر، بازده بالاتری نسبت به بازوهای متصل شونده نامساوی دارند. دمای اتصال دئوکسی ریبوزایم طراحی شده با نرم‌افزارهای مختلف بررسی شد. با در نظر گرفتن انواع این پارامترها طراحی دئوکسی ریبوزایم با کیفیت مطلوبی انجام شد. ساختار نهایی دئوکسی ریبوزایم طراحی شده در تصویر شماره ۵ نشان داده شده است.



**تصویر شماره ۵: دئوکسی ریبوزایم ۲۳-۱۰ طراحی شده نهایی**

بازوهای متصل شونده، هسته کاتالیتیک، جایگاه هدف و نقطه برش توسط دئوکسی ریبوزایم مشخص شده است.

### بحث:

دئوکسی ریبوزایم‌ها با هدف قرار دادن ژن‌های مهم در فرایند بیماری‌ها می‌توانند در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان مورد استفاده قرار بگیرند. دئوکسی ریبوزایم ۲۳-۱۰ برای کاهش بیان ژن‌های مهم درمانی به کار گرفته می‌شود.

قابل توجه است که هر بازو به تنهایی  $T_m$  پایین‌تری دارد و این امر باعث جدا شدن محصول حاصل از عملکرد آنزیم شده و دئوکسی ریبوزایم را تبدیل به یک آنزیم multi turnover می‌کند. در این مطالعه نوع دئوکسی ریبوزایم طراحی شده با  $T_m$  ۶۹/۲ و ۵۰٪ GC بیان گردیده است.



شود (۴۷). جایگاه هدف باید در نقطه‌ای انتخاب شود که از نظر انجام فرایند ترجمه حائز اهمیت بوده و در جایگاه مناسبی باشد.

### نتیجه‌گیری:

نتایج نشان می‌دهد که با در نظر گرفتن دمای اتصال بازوها به هدف، ساختار ثانویه هدف و طول بازوها در طراحی دئوکسی‌ریبوزایم، می‌توان آنزیمی طراحی کرد که در وضعیت مطلوبی باشد. دمای اتصال دئوکسی‌ریبوزایم طراحی شده نیز با نرم‌افزارهای مختلف بررسی شد؛ بنابراین دئوکسی‌ریبوزایم مناسب علیه ژن *lacZ* با طول بازوی متصل شونده ۹ بازی و دمای اتصال و جایگاه هدف مناسب، طراحی شد. جایگاه هدف دئوکسی‌ریبوزایم طراحی شده در ناحیه غیرترجمه‌شونده قبل از کدون آغاز قرار دارد و در فرایند شروع ترجمه نقش دارد. طبق بررسی‌های انجام شده با نرم‌افزارهای یاد شده دئوکسی‌ریبوزایم اتصال مطلوبی با هدف خود خواهد داشت.

### تشکر و قدردانی:

از کلیه مسئولین دانشگاه اصفهان به علت تأمین هزینه‌های این تحقیق تقدیر و تشکر می‌شود. این تحقیق از پایان‌نامه مصوب دانشگاه اصفهان به شماره الف/۳۴۹۵۷/۹۴ مورخ ۹۴/۶/۲۴ می‌باشد.

دئوکسی‌ریبوزایم ها کاربردهای ضدویروسی، ضدباکتریایی، ضدسرطان دارند و همچنین برای درمان بیماری‌های قلبی- عروقی و بیماری‌های دستگاه عصبی مرکزی استفاده می‌شوند (۲۶-۳۶، ۷). علاوه بر کاربردهای درمانی و تشخیصی، از دئوکسی‌ریبوزایم‌ها در ساخت نانو موتورهای مولکولی استفاده می‌شود (۳۷-۴۱، ۲۰).

تاکنون گزارش منتشر شده‌ای در رابطه با طراحی DNAzymes برای مهار آغاز ترجمه ژن *lacZ* یافت نشده است. جایگاه غیر ترجمه شونده قبل از کدون آغاز به دلیل حضور توالی‌های درگیر در اتصال ریبوزوم بهترین موقعیت برای طراحی دئوکسی‌ریبوزایم علیه ژن هدف است. این ناحیه در شروع فرایند ترجمه و بازده وقوع فرایند ترجمه نقش اساسی دارد (۴۲-۴۴، ۲۵). در مورد طول بازوهای متصل شونده، طول ۹ نوکلئوتیدی و دو بازوی هم‌اندازه انتخاب شد. دلیل این انتخاب رسیدن به دمای اتصال مطلوب بود. همچنین، اینکه طول ۹ باز برای بازوهای متصل شونده طبق گزارش‌ها انجام شده بازده مطلوبی خواهد داشت (۴۵). علاوه بر این بازوهای متصل شونده برابر بازده بالاتری نسبت به بازوهای متصل شونده نامساوی دارند (۴۶). درصد GC در توالی هدف در تنظیم Tm دئوکسی‌ریبوزایم موثر است. ساختار ثانویه mRNA هدف برای امکان اتصال دئوکسی‌ریبوزایم طراحی شده و باز کردن ساختار متصل شدن دارای اهمیت است و باید در نظر گرفته

### منابع:

1. Khan A, Benboubetra M, Sayyed PZ, Wooi Ng K, Fox S, Beck G, et al. Sustained polymeric delivery of gene silencing antisense ODNs, siRNA, DNAzymes and ribozymes: *In vitro* and *in vivo* studies. *J Drug Target*. 2004; 12(6): 393-404.
2. Kumar B, Asha K, Chauhan S. DNAzyme mediated post-transcriptional gene silencing: A novel therapeutic approach; 2013. Available from: [https://www.webmedcentral.com/article\\_view/4415](https://www.webmedcentral.com/article_view/4415).
3. Baum D, Silverman S. Deoxyribozymes: Useful DNA catalysts *in vitro* and *in vivo*. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65(14): 2156-74.
4. Zhang G, Dass CR, Sumithran E, Di Girolamo N, Sun L-Q, Khachigian LM. Effect of deoxyribozymes targeting c-Jun on solid tumor growth and angiogenesis in rodents. *J Natl Cancer Inst*. 2004; 96(9): 683-96.
5. Schubert S, Kurreck J. Ribozyme-and deoxyribozyme-strategies for medical applications. *Curr Drug Targets*. 2004; 5(8): 667-81.

6. Santoro SW, Joyce GF. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci*. 1997; 94(9): 4262-6.
7. Singh N, Ranjan A, Sur S, Chandra R, Tandon V. Inhibition of HIV-1 Integrase gene expression by 10-23 DNAzyme. *J Biosci*. 2012; 37(3): 493-502.
8. Chen F, Li Z, Wang R, Liu B, Zeng Z, Zhang H, et al. Inhibition of ampicillin-resistant bacteria by novel mono-DNAzymes and di-DNAzyme targeted to  $\beta$ -lactamase mRNA. *Oligonucleotides*. 2004; 14(2): 80-9.
9. Hou Z, LIU J, JIA M. Inhibition of  $\beta$ -lactamase-mediated oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* by a deoxyribozyme. *Acta Pharmacol Sin*. 2007; 28(11): 1775-82.
10. Hou Z, Meng JR, Niu C, Wang HF, Liu J, Hu BQ, et al. Restoration of antibiotic susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by targeting *mecr1* with a phosphorothioate deoxyribozyme. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007; 34(11): 1160-4.
11. Wu Y, Yu L, McMahon R, Rossi JJ, Forman SJ, Snyder DS. Inhibition of bcr-abl oncogene expression by novel deoxyribozymes (DNAzymes). *Hum Gene Ther*. 1999; 10(17): 2847-57.
12. Dass CR, Choong PF, Khachigian LM. DNAzyme technology and cancer therapy: Cleave and let die. *Mol Cancer Ther*. 2008; 7(2): 243-51.
13. Qu Y, Zhang L, Mao M, Zhao F, Huang X, Yang C, et al. Effects of DNAzymes targeting Aurora kinase A on the growth of human prostate cancer. *Cancer Gene Ther*. 2008; 15(8): 517-25.
14. Xu Z, Yang L, Sun L, Cao Y. Use of DNAzymes for cancer research and therapy. *Chin Sci Bull*. 2012; 57(26): 3404-8.
15. Kim J, Yoon S, Choi B, Kim K, Cho Y, Jung W, et al. Cleavage of BCR-ABL transcripts at the T315I point mutation by DNAzyme promotes apoptotic cell death in imatinib-resistant BCR-ABL leukemic cells. *Leukemia*. 2013; 27(8): 1650-8.
16. Fokina AA, Stetsenko DA, François J-C. DNA enzymes as potential therapeutics: Towards clinical application of 10-23 DNAzymes. *Expert Opin Biol Ther*. 2015; 15(5): 689-711.
17. Silverman SK. Catalytic DNA: scope, applications, and biochemistry of deoxyribozymes. *Trends Biochem Sci*. 2016; 41(7): 595-609.
18. Sheng Y, Zeng Z, Peng W, Jiang D, Li S, Sun Y, et al. Design and switch of catalytic activity with the DNAzyme-RNAzyme combination. *FEBS letters*. 2007; 581(9): 1763-8.
19. Kurreck J, Bieber B, Jahnel R, Erdmann VA. Comparative study of DNA enzymes and ribozymes against the same full-length messenger RNA of the vanilloid receptor subtype I. *J Biol Chem*. 2002; 277(9): 7099-107.
20. Lu Y, Liu J. Functional DNA nanotechnology: emerging applications of DNAzymes and aptamers. *Curr Opin Biotechnol*. 2006; 17(6): 580-8.
21. Breaker RR, Joyce GF. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem Biol*. 1994; 1(4): 223-9.
22. Miller JH. The *lacI* gene: Its role in *lac* operon control and its use as a genetic system. *Operon*. 1978: 31-88.
23. Iost I, Dreyfus M. The stability of *Escherichia coli lacZ* mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *EMBO J*. 1995; 14(13): 3252.
24. Beckwith JR. Regulation of the *lac* operon. *Science*. 1967; 156(3775): 597-604.
25. Salis HM. 2 The Ribosome Binding Site Calculator. *Methods Enzymol*. 2011; 498: 19-42.
26. Reyes-Gutierrez P, Alvarez-Salas LM. Cleavage of HPV-16 E6/E7 mRNA Mediated by Modified 10-23 Deoxyribozymes. *Oligonucleotides*. 2009; 19(3): 233-42.
27. Bano AS, Gupta N, Sharma Y, Sood V, Banerjee AC. HIV-1 VprB and C RNA cleavage by potent 10-23 DNAzymes that also cause reversal of G2 cell cycle arrest mediated by Vpr genes. *Oligonucleotides*. 2007; 17(4): 465-72.
28. Xie Y-Y, Zhao X-D, Jiang L-P, Liu H-L, Wang L-J, Fang P, et al. Inhibition of respiratory syncytial virus in cultured cells by nucleocapsid gene targeted deoxyribozyme (DNAzyme). *Antiviral Res*. 2006; 71(1): 31-41.
29. Trepanier J, Tanner J, Momparler R, Le O, Alvarez F, Alfieri C. Cleavage of intracellular hepatitis C RNA in the virus core protein coding region by deoxyribozymes. *J Viral Hepat*. 2006; 13(2): 131-8.
30. Hou W, Ni Q, Wo J, Li M, Liu K, Chen L, et al. Inhibition of hepatitis B virus X gene expression by 10-23 DNAzymes. *Antiviral Res*. 2006; 72(3): 190-6.

31. Hou W, Wo J-E, Li M-W, Liu K-Z. *In vitro* cleavage of hepatitis B virus C mRNA by 10-23 DNA enzyme. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2005; 4(4): 573-6.
32. Unwalla H, Banerjea AC. Inhibition of HIV-1 gene expression by novel macrophage-tropic DNA enzymes targeted to cleave HIV-1 TAT/Rev RNA. *Biochem J.* 2001; 357(1): 147-55.
33. GOILA R, BANERJEA AC. Inhibition of hepatitis B virus X gene expression by novel DNA enzymes. *Biochem J.* 2001; 353(3): 701-8.
34. Toyoda T, Imamura Y, Takaku H, Kashiwagi T, Hara K, Iwahashi J, et al. Inhibition of influenza virus replication in cultured cells by RNA-cleaving DNA enzyme. *FEBS Letters.* 2000; 481(2): 113-6.
35. Basu S, Sriram B, Goila R, Banerjea AC. Targeted cleavage of HIV-1 coreceptor-CXCR-4 by RNA-cleaving DNA-enzyme: inhibition of coreceptor function. *Antiviral Res.* 2000; 46(2): 125-34.
36. Dash BC, Harikrishnan T, Goila R, Shahi S, Unwalla H, Husain S, et al. Targeted cleavage of HIV-1 envelope gene by a DNA enzyme and inhibition of HIV-1 envelope-CD4 mediated cell fusion. *FEBS letters.* 1998; 431(3): 395-9.
37. McManus SA. Characterization and application of self-phosphorylating deoxyribozymes; 2012. Available from: <https://macsphere.mcmaster.ca/handle/11375/12405>.
38. Krishnan Y, Bathe M. Designer nucleic acids to probe and program the cell. *Trends Cell Biol* 2012; 22(12): 624-33.
29. Chen Y, Wang M, Mao C. An autonomous DNA nanomotor powered by a DNA enzyme. *Angew Chem Int Ed.* 2004; 43(27): 3554-7.
40. Chen Y, Mao C. Putting a brake on an autonomous DNA nanomotor. *J Am Chem Soc.* 2004; 126(28): 8626-7.
41. Emilsson G, Breaker R. Deoxyribozymes: new activities and new applications. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59(4): 596-607.
42. Kim K, Choi W, Gong S, Oh S, Kim JH, Kim D. Efficient target site selection for an RNA-cleaving DNAzyme through combinatorial library screening. *Bull Korean Chem Soc.* 2006; 27(5): 657.
43. Kaberdin VR, Bläsi U. Translation initiation and the fate of bacterial mRNAs. *FEMS Microbiol Rev.* 2006; 30(6): 967-79.
44. Deana A, Belasco JG. Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes Dev.* 2005; 19(21): 2526-33.
45. Cairns MJ, Hopkins TM, Witherington C, Sun L-Q. The influence of arm length asymmetry and base substitution on the activity of the 10-23 DNA enzyme. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000; 10(5): 323-32.
46. Ackermann JM, Kanugula S, Pegg AE. DNAzyme-mediated silencing of ornithine decarboxylase. *Biochemistry.* 2005; 44(6): 2143-52.
47. Tan X-X, Rose K, Margolin W, Chen Y. DNA enzyme generated by a novel single-stranded DNA expression vector inhibits expression of the essential bacterial cell division gene *ftsZ*. *Biochemistry.* 2004; 43(4): 1111-7.

## Bioinformatics designing of 10-23 deoxyribozyme against noncoding region before start codon of beta-galactosidase gene (lacZ) in pGEM-T vector

Sadeghi S<sup>1</sup>, Esmaeili A<sup>2\*</sup>, Javadi Zarnaghi F<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Student, Biology Dept., University of Isfahan, Isfahan, I.R. Iran; <sup>2</sup>Biology Dept., University of Isfahan, Isfahan, I.R. Iran.

Received: 10/Oct/2016 Accepted: 8/Jan/2017

**Background and aims:** Deoxyribozymes are oligoribodeoxynucleotides that catalyze reactions such as cutting RNA and have diagnostic and therapeutic applications. Deoxyribozyme 10-23 includes a catalytic domain dependent on a fixed 15-nucleotide (mer) cation and two variable binding arms that cause the specificity of enzymes. Lactose operon is used in the white-blue screening process. This operon includes three polycistronic genes. In this study, a deoxyribozyme against  $\alpha$ -peptide beta-galactosidase gene in the lactose operon was designed.

**Methods:** pGEM-T map was obtained from addgene server and  $\alpha$ -peptide gene sequence was determined. Then, using expasy website proper protein frame in comparison with various reading frames was determined. In this step, whole sequence was reversed and mRNA sequence was achieved. Secondary structure with the lowest free energy was gained using mfold server. Considering the fact that 10-23 deoxyribozyme has cutting capability between a unpaired purine and pairs pyrimidine; an AC was selected in ribosome binding site in the untranslated region and then 9 open bases on either side of it was used as a binding arms. Investigation of the absence of similar sequences in host bacteria was performed by NCBI server. Finally, activity and binding of deoxyribozyme was predicted by the mfold server.

**Results:** The results of this study showed that the designed deoxyribozyme had a relatively high T<sub>m</sub> with two 9-nucleotide arms, which increased its effectiveness.

**Conclusion:** The results of this study can be used to control the expression of lacZ gene as a biomarker.

**Keywords:** Deoxyribozyme, Ribosome binding site, Secondary structure, Melting temperature, pGEM-T plasmid.

**Cite this article as:** Sadeghi S, Esmaeili A, Javadi Zarnaghi F. Bioinformatics designing of 10-23 deoxyribozyme against noncoding region before start codon of beta-galactosidase gene (lacZ) in pGEM-T vector. J Shahrekord Univ Med Sci. 2018; 19(6): 1-12.

\*Corresponding author:

Biology Dept., University of Isfahan, Isfahan, I.R. Iran. Tel: 00989137152511,  
E-mail: aesmaeili@sci.ui.ac.ir